

- 10 J. D. Rabinowitz and E. Kimball, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 6167–6173.
- 11 M. Cashel, D. R. Gentry, V. J. Hernandez and D. Vinella, in *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, 1992, 2nd edn.
- 12 C. Eymann, G. Homuth, C. Scharf and M. Hecker, *J. Bacteriol.*, 2002, **184**, 2500–2520.
- 13 O. Brockmann-Gretza and J. Kalinowski, *BMC Genomics*, 2006, **7**, 230.
- 14 A. Hesketh, J. Chen, J. Ryding, S. Chang and M. Bibb, *Genome Biol.*, 2007, **8**, R161.
- 15 I. M. Keseler, J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, J. Ingraham, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil and P. D. Karp, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, D334–337.
- 16 <http://ecocyc.org/>.
- 17 A. Nagai, E. Ward, J. Beck, S. Tada, J. Y. Chang, A. Scheidegger and J. Ryals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1991, **88**, 4133–4137.
- 18 J. C. Loper and E. Adams, *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 257–268.
- 19 H. S. Moyed and M. Friedman, *Science*, 1959, **129**, 968–969.
- 20 M. E. Winkler, D. J. Roth and P. E. Hartman, *J. Bacteriol.*, 1978, **133**, 830–843.
- 21 J. C. Stephens, S. W. Artz and B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, **72**, 4389–4393.
- 22 N. Ishii, K. Nakahigashi, T. Baba, M. Robert, T. Soga, A. Kanai, T. Hirasawa, M. Naba, K. Hirai, A. Hoque, P. Y. Ho, Y. Kakazu, K. Sugawara, S. Igarashi, S. Harada, T. Masuda, N. Sugiyama, T. Togashi, M. Hasegawa, Y. Takai, K. Yugi, K. Arakawa, N. Iwata, Y. Toya, Y. Nakayama, T. Nishioka, K. Shimizu, H. Mori and M. Tomita, *Science*, 2007, **316**, 593–597.
- 23 J. Quackenbush, *Nat. Rev. Genet.*, 2001, **2**, 418–427.
- 24 H. E. Umbarger, in *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, 1992, 2nd edn.
- 25 C. A. Ouzounis and P. D. Karp, *Genome Res.*, 2000, **10**, 568–576.
- 26 H. Ogata, S. Goto, K. Sato, W. Fujibuchi, H. Bono and M. Kanehisa, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 29–31.
- 27 <http://www.genome.jp/kegg/>.
- 28 J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989, 2nd edn.
- 29 T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori, *Mol. Syst. Biol.*, 2006, **2**, 2006.0008.
- 30 T. Soga, T. Ishikawa, S. Igarashi, K. Sugawara, Y. Kakazu and M. Tomita, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1159**, 125–133.
- 31 A. Kheirloomoom, J. Mano, A. Nagai, A. Ogawa, G. Iwasaki and D. Ohta, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, **312**, 493–500.

[特集：最新のキャピラリー電気泳動とチップ電気泳動]

## CE-MS によるメタボローム解析

曾我朋義

## SUMMARY

Metabolomics, which can be defined as the measurement of the level of all intracellular metabolites, has become a powerful new tool for gaining insight into cellular and physiological responses. Here we have developed a comprehensive and quantitative analysis method based on capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS). In this marriage of techniques, CE confers rapid analysis and efficient resolution, and MS provides excellent selectivity and sensitivity. Previous work in our laboratory demonstrated that CE-MS techniques were quite useful for the metabolome analysis. We applied this approach to profile liver metabolites following acetaminophen-induced hepatotoxicity and revealed ophthalmate as a sensitive indicator of reduced glutathione (GSH) depletion. Our results specifically indicate that serum ophthalmate is a sensitive indicator of hepatic GSH depletion, and may be a new biomarker for oxidative stress.

Key words: metabolomics, capillary electrophoresis mass spectrometry, drug induced hepatotoxicity, biomarker, glutathione.

## 緒言

メタボローム解析は細胞内の代謝産物をバイアスをかけない手法により網羅的に探索し、新規の代謝経路やこれまで解明されなかった代謝調節機構、あるいは遺伝子やタンパク質の機能やこれらの生体分子との相互作用を解き明かそうとする方法論である。メタボローム研究は、医薬分野におけるがんや代謝異常などの疾病機序の解明、病体の診断、バイオマーカー探索、発酵分野におけるアミノ酸や核酸生産用の工業用微生物の開発などの応用研究にも有効な解決策を与えるのではないかと期待されている。

ほとんどの生物が有している解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸回路に代表されるエネルギー代謝やアミノ酸、核酸生合成経路の代謝物の多くは、リン酸基、カルボキシル基、アミノ基等を持つイオン性物質であり、UV 吸収がない、不揮発性などの特徴を有す。さらに、物理的・化学的性質が類似している異性体から、性質が全く異なるものまで、数百種類（微生物）から数万種類（植物）の代謝

中間体が存在する。最近のメタボローム研究への関心の高まりに伴い、GC/MS, LC-MS, フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICR/MS), NMR 等を用いるいくつかのメタボローム測定法が開発された。しかし、決定的なメタボロームの分析法は未だ確立されていない。

我々は、細胞内に存在する代謝物のほとんどが電荷を持っていることに着目し、イオン性化合物に対して高分離能を示すキャピラリー電気泳動 (CE) と高い選択性と感度を提供する質量分析装置 (MS) を組み合わせた CE-MS 法を開発した<sup>1)</sup>。この手法により、細胞内に存在する千種類以上の代謝物質の一斉分析を可能にした<sup>1)</sup>。CE-MS 法の利点は、ほとんどのイオン性物質を測定できることと、イオンサプレッションの影響を受けず定量性が極めて高いことである<sup>2)</sup>。

近年、さらに高速走査かつ高分解能を有する飛行時間型質量分析計 (TOFMS) を CE に接続させた CE-TOFMS 法を開発し<sup>3)</sup>、精密質量 (ミリ原子質量単位) での代謝物の一斉高感度分析を達成した。我々は、これまでに CE-MS,

Metabolome analysis by CE-MS.

Tomoyoshi Soga; 慶應義塾大学先端生命科学研究所

Correspondence address: Tomoyoshi Soga; Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 246-2 Mizukami, Kakuganji, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan.

Fax: 0235-29-0574

E-mail: soga@sfc.keio.ac.jp

(受付 2008 年 5 月 16 日, 受理 2008 年 7 月 11 日, 刊行 2008 年 9 月 15 日)

CE-TOFMS法を微生物<sup>1,4)</sup>, 植物<sup>5)</sup>, 哺乳動物<sup>3,6)</sup>などの細胞, 組織のメタボローム測定に応用してきた. 本稿では, CE-MS法によるメタボローム測定法の原理, 本法により発見された解熱鎮痛剤の副作用バイオマーカーについて報告する.

方法

1) CE-MSによるメタボローム測定法

Fig. 1に示したように, 細胞から抽出した代謝物をキャピラリー電気泳動に注入後, 数万ボルトの電圧を印加すると, 各代謝物質は, その物質の電荷/水和イオン半径の比に基づき泳動し, キャピラリー内で分離後, キャピラリーの出口に接続された質量分析計 (MS) で選択的に検出される. 試料中の陽イオン性代謝物は陰極方向に, また陰イオンは陽極方向に移動する. したがって, 二種類のCE-MSの測定条件でほとんどのイオン性代謝物質を直接定量分析することができる.

2) アセトアミノフェン投与マウスのメタボローム測定

欧米では解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン (APAP) の過剰摂取により, 年間百名以上が急性肝炎で死亡する. そこでAPAPをマウスに腹腔内投与し, 急性肝炎を誘発したマウスとコントロール (生理食塩水投与) マウスの肝臓および血液の代謝物質をCE-TOFMSで網羅的に測定した<sup>3)</sup>. また未知物質を特定するため, CEにハイブリッド四重極

飛行時間型質量分析計 (Q-TOFMS) を接続したCE-Q-TOFMS法でMS/MSスペクトルを採取した<sup>3)</sup>.

結果

1) アセトアミノフェン投与マウスのメタボローム解析

コントロールとAPAP投与後2時間マウス (急性肝炎を誘発) の肝臓のメタボローム測定を行い, 変化のあった代謝物質をAPAPの代謝経路にマップした (Fig. 2). APAPの99%は肝臓でグルクロン酸か硫酸に抱合され, 尿中に排泄される. しかし1%はチトクロムP450により代謝され, 毒性の高い親電子物質NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine) が生合成される. 通常NAPQIは肝細胞内に大量に存在する還元型グルタチオン (GSH) に抱合され, 尿中に排泄される. しかし, APAPが過剰に存在するとGSHが枯

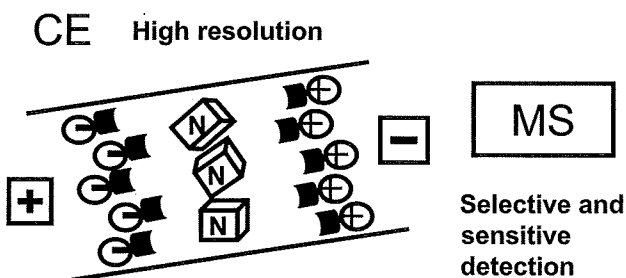


Fig. 1. Schematic of CE-MS for metabolome analysis.

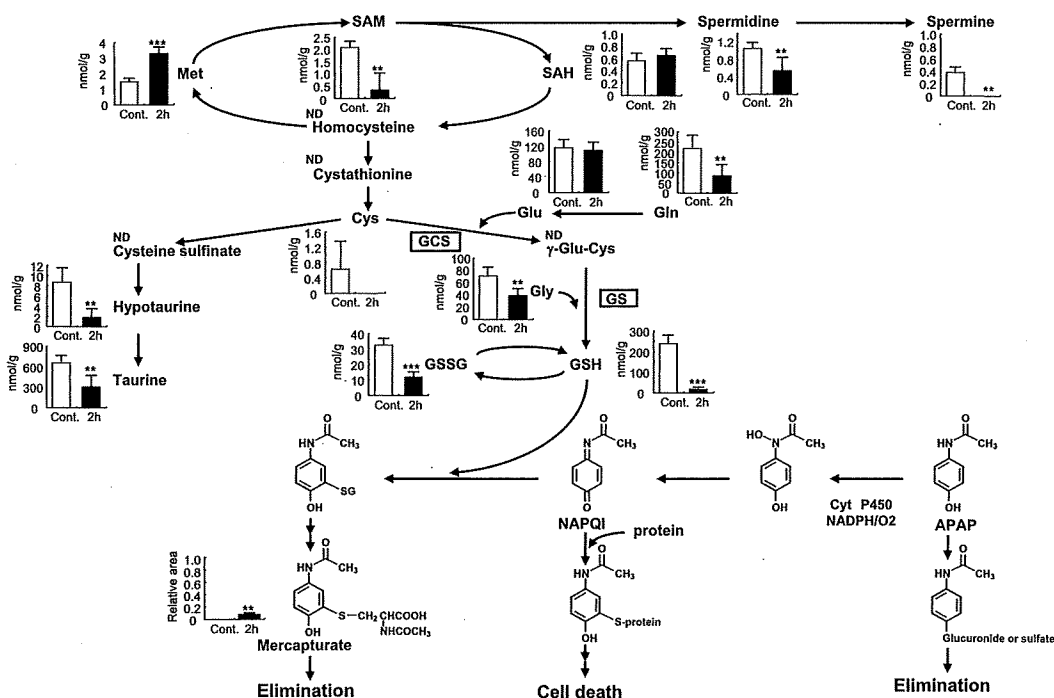


Fig. 2. Observed metabolite changes mapped onto the pathways involved in acetaminophen metabolism and its elimination.

Changes in hepatic metabolite levels in the controls and mice injected 2 h earlier with APAP. Asterisks indicate statistically significant differences (\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ). Relative area indicates the ratio of the peak area of mercapturate to that of 200  $\mu$ M methionine sulfone (internal standard). ND; not detected.

渴し, NAPQI が蓄積して様々なタンパク質と結合するため, 肝細胞の壊死を引き起こす. Fig. 2 に示したように, APAP 投与後 2 時間のマウスでは, Cys 以降のグルタチオン合成経路の代謝物質が軒並み減少する<sup>3)</sup>.

### 2) オフタルミン酸生成経路の発見

メタボローム解析により, APAP 投与 2 時間後に有意に増加する未知物質を発見した. 未知物質の移動時間が GSH と一致したため, GSH に構造が類似していることが予想された. 我々は CE-Q-TOFMS を用いて GSH と未知物質の MS/MS スペクトルを採取した結果, 未知物質は GSH の SH 基が CH<sub>3</sub> 基に置換されたオフタルミン酸と推定した. さらに標品による添加試験により未知物質は予想どおりオフタルミン酸であることが確認された<sup>3)</sup>.

次に APAP 投与によりオフタルミン酸が増加する機序を検討した. Fig. 3 に示すように GSH ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) は  $\gamma$ -グルタミルシステインシンセターゼ (GCS) とグルタチオンシンセターゼ (GS) の二つの酵素によって, Cys から合成されたトリペプチドである. 我々は, オフタルミン酸 ( $\gamma$ -Glu-2AB-Gly) は Cys の SH 基が CH<sub>3</sub> 基に置換された 2-アミノ酪酸 (2AB) から GSH と同様に GCS と GS の酵素によって生合成されるのではないかと推測した (Fig. 3). そこで GCS を抑制するプテオニンスルフォキシミンや GCS を活性化する親電子物質ジエチルマレイン酸をマウスに投与後, GSH およびオフタルミン酸合成経路の代謝物質を定量分析し, その測定結果からこの仮説が正しいことを証明した<sup>3)</sup>.

### 3) 肝臓のグルタチオン枯渇マーカーの発見

Fig. 4 に示すように肝臓内の GSH は急性肝炎が誘発される APAP 投与 1, 2 時間後に大幅に減少した. GSH の減少に反比例して肝臓内の  $\gamma$ -Glu-2AB (オフタルミン酸の前駆体) とオフタルミン酸は急増した (Fig. 4A). また, 血清中のオフタルミン酸も肝臓中同様に APAP 投与 1, 2 時間後に急増した (Fig. 4B). これらの結果は, 血中オフタルミン酸は肝臓の GSH が低下したことを示すバイオマーカーであることを示す<sup>3)</sup>.

実験結果を総括すると, 通常の還元状態 (Fig. 3A) では, 肝細胞内に GSH が大量に存在し, これが GCS をフィードバック制御しているため GSH やオフタルミン酸の生合成は阻害される<sup>7,8)</sup>. しかし, APAP の代謝で生じた親電子物質 (NAPQI) の解毒のために GSH が消費されると (Fig. 3B), GCS に対するフィードバック制御が解除され, GCS が活性化される. したがって, オフタルミン酸が生合成される. しかしオフタルミン酸は SH 基を有していないため, 親電子物質とは反応せず肝細胞内に蓄積し, ABC トランスポーター等で最終的に血液中に排泄される (Fig. 3)<sup>3)</sup>.

筆者らが知る限り, オフタルミン酸の生理学的な役割はこれまで述べられていないが, オフタルミン酸は ABC トランスポーターによる GSH の細胞外への輸送を競争的に阻害するという報告がある<sup>9)</sup>. 肝細胞はオフタルミン酸を生合成して細胞外に排出することで GSH を細胞内に留め, 親電子物質に対する防御機構を備えているのであろう.

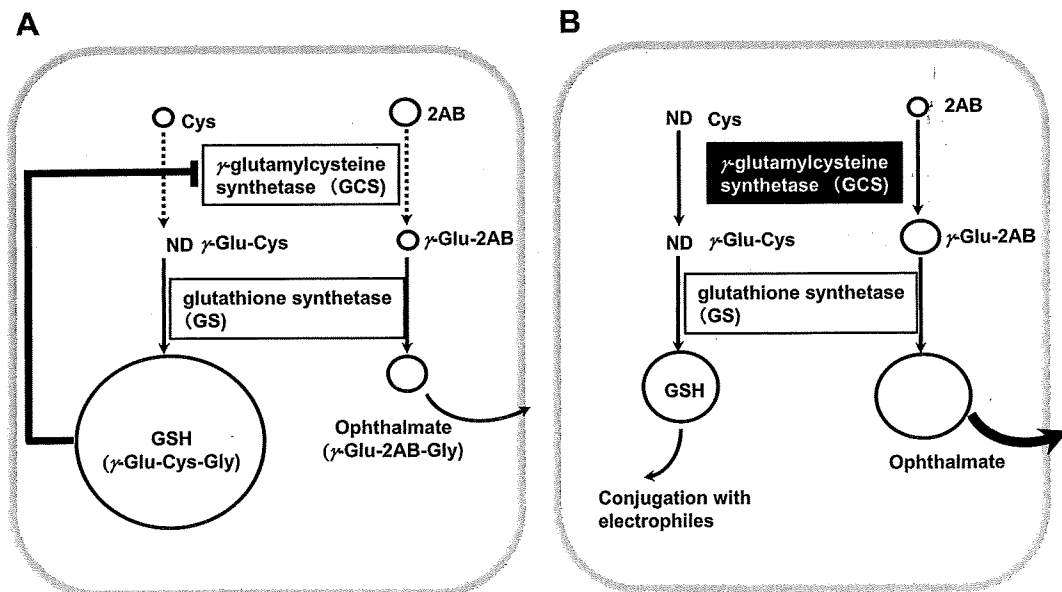


Fig. 3. Mechanism of ophthalmate biosynthesis in hepatocytes.

(A)GCS is feedback-inhibited by GSH under reducing condition and little ophthalmate is thus synthesized. (B)During oxidative stress, GSH is consumed, leading to GCS activation (as indicated in black), and resulting in biosynthesis of ophthalmate. The area of metabolite circles is proportional to their measured abundance in liver. ND; not detected.

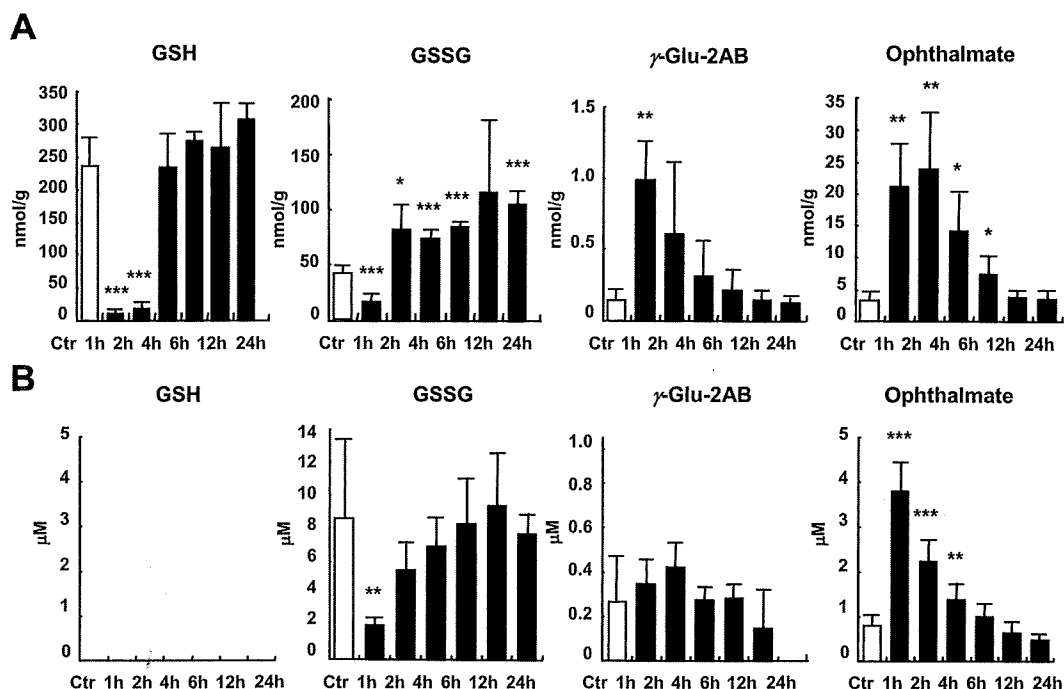


Fig. 4. Changes in metabolite levels in (A) mouse liver and (B) serum 1, 2, 4, 6, 12, and 24 h after APAP treatment (n=4). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ).

謝 辞

本研究は慶應義塾大学医学部医化学教室(末松 誠教授)との共同研究の成果である。

文 献

- 1) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2003; 2:488-494.
- 2) Soga T, Ishikawa T, Igarashi S, Sugawara K, Kakazu Y, Tomita M. Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis-mass spectrometry using silanol mask technique. *J Chromatogr A* 2007;1159:125-133.
- 3) Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 2006; 281:16768-16776.
- 4) Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M, Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T,

Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y, Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H, Tomita M. Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science* 2007;316:593-597.

- 5) Sato S, Soga T, Nishioka T, Tomita M. Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J* 2004;40: 151-163.
- 6) Kinoshita A, Tsukada K, Soga T, Hishiki T, Ueno Y, Nakayama Y, Tomita M, Suematsu M. Roles of hemoglobin allosteric in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis. *J Biol Chem* 2007;282:10731-10741.
- 7) Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 1975;250:1422-1426.
- 8) Cuozzo JW, Kaiser CA. Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat Cell Biol* 1999;1:130-135.
- 9) Ballatori N, Dutcak WJ. Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem* 1994;269:19731-19737.

## 8. メタボローム解析による 癌微小環境のエネルギー代謝の解明

紙健次郎, 富塚江利子, 富田 勝, 北 潔, 江角浩安, 曾我朋義

メタボローム解析技術は近年目覚ましい発展を遂げ、特にキャピラリー電気泳動質量分析装置 (CE-MS) によるイオン性低分子化合物の一斉分析は、生体由来サンプルに含まれる代謝物質の網羅的解析にきわめて有用である。一方、癌の微小環境における代謝に関してはワーバーク効果など古くから着目されてきたものの、効果的な分析手法の欠如などの理由からいまだ未知の部分が多い。ここではCE-MSによるメタボローム解析の流れとその技術を応用した癌の微小環境における特殊なエネルギー代謝機構の解明に向けた取り組みを紹介する。

### はじめに

メタボローム解析技術の進歩により、近年のメタボロミクス研究の発展は目覚ましいものがある。さまざまな解析手法がしのぎを削るなか、われわれはキャピラリー電気泳動質量分析装置 (CE-MS<sup>\*1</sup>) を用いたイオン性低分子化合物の網羅的測定法を確立した。CE-MSによるメタボローム解析技術の詳細については文献<sup>1)~3)</sup>を参照されたい。特にエネルギー代謝に

関連する一連の物質を一斉に同定・定量可能であるこの手法は、疾患や副作用に関するバイオマーカーの探索はもちろんのことさまざまな遺伝子変異や環境ストレスによる癌細胞内外の代謝変化の解明に最適である。そこで本稿では、まずCE-MSによるメタボローム解析の概要を述べ、次にこの装置を応用した癌メタボロミクスに関する研究成果を紹介する。

### 1 CE-MSによるメタボローム解析技術

CE-MSは、現在一般的に使われているNMRやLC-MS, GC-MSなどでは一斉分析が難しいイオン性低分子化合物の網羅的な測定が可能であり、この特徴を

#### 【キーワード&略語】

メタボローム解析, 癌微小環境, エネルギー代謝, フマル酸呼吸, パモ酸ピルビニウム

CE-MS : capillary electrophoresis mass spectrometry

(キャピラリー電気泳動質量分析装置)

PET : positron emission tomography

(陽電子放射断層撮影法)

HDF : human dermal fibroblast

(ヒト皮膚線維芽細胞)

#### ※1 CE-MS

キャピラリー電気泳動装置 (capillary electrophoresis : CE) を質量分析装置 (mass spectrometry : MS) に接続した分析装置。サンプル溶液に含まれる化合物が、キャピラリーの両端に印加した高電圧により各物質の (電荷/イオン半径) の比に基づいて移動し、質量分析計により各物質の固有の質量にて高選択、高感度に一斉分析される測定法。

Metabolome analysis of energy metabolism in tumor microenvironment

Kenjiro Kami<sup>1)</sup>/Eriko Tomitsuka<sup>2) 3)</sup>/Masaru Tomita<sup>1)</sup>/Kiyoshi Kita<sup>3)</sup>/Hiroyasu Esumi<sup>2)</sup>/Tomoyoshi Soga<sup>1)</sup> : Institute for Advanced Biosciences, Keio University<sup>1)</sup>/Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East<sup>2)</sup>/Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo<sup>3)</sup> (慶應義塾大学先端生命科学研究所<sup>1)</sup>/国立がんセンター東病院臨床開発センター<sup>2)</sup>/東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻生物医学化学教室<sup>3)</sup>)

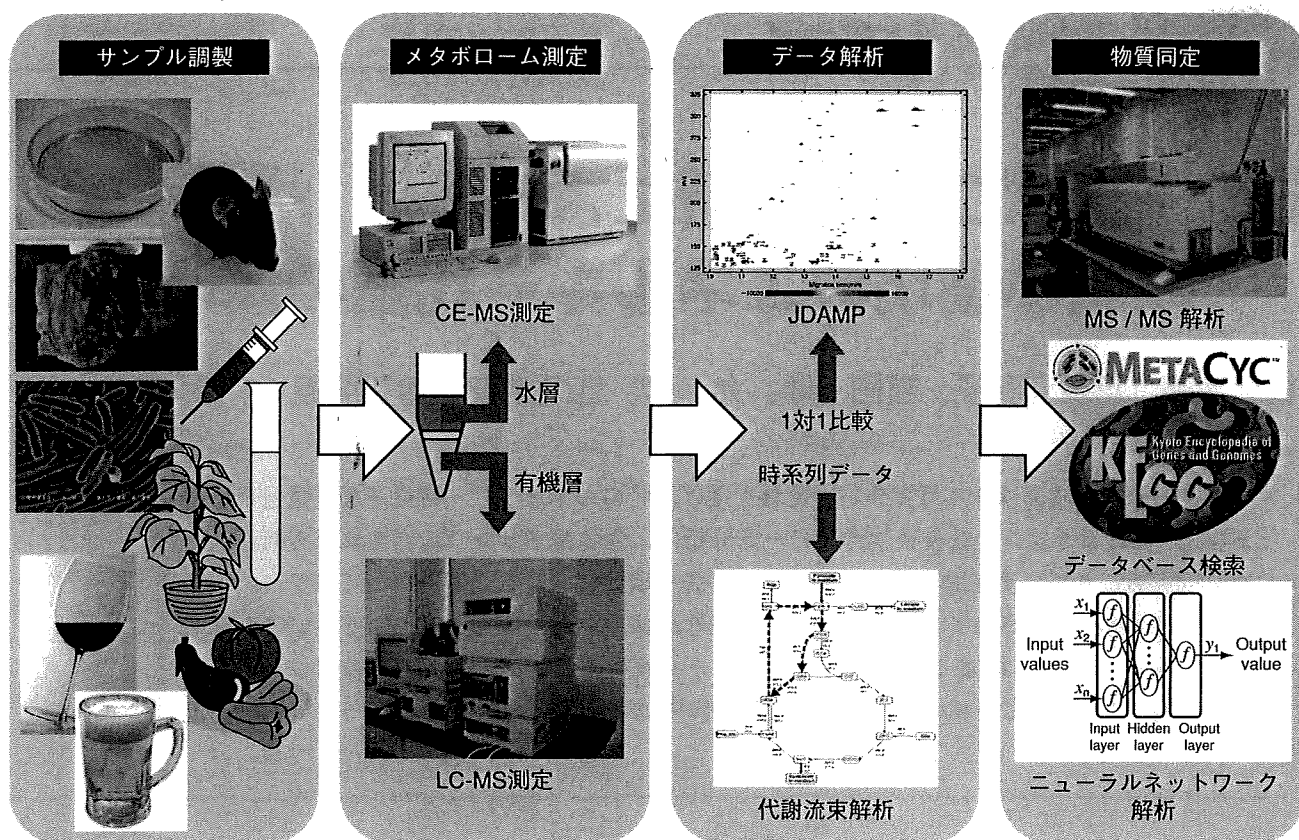


図1 メタボローム解析の流れ (巻頭カラー図17参照)

血液・尿・臨床組織などのヒト由来サンプル以外にも、微生物・植物・食品・飲料品など実にさまざまなサンプルの測定が可能である。必要に応じてLC-MSやGC-MSなどを併用し、中性物質や脂溶性物質の測定を行うことによりさらに網羅性を向上させている。また、バイオマーカー候補となる未知物質の同定にはMS/MS解析などが欠かせない

活かしてすでに微生物<sup>4)~6)</sup>をはじめ動植物組織<sup>2) 7)</sup>、血液・尿・唾液・涙などの体液<sup>8)</sup>、食品および飲料に至るまで幅広いサンプルの分析を実現してきた。

癌メタボローム研究においても、マウスやラットのさまざまな組織切片や体液、ヒトの臨床検体、そして培養細胞における細胞および培養液サンプルなどのメタボローム解析手法を確立してきた。具体的には解糖系やペントースリン酸回路、クエン酸回路、尿素回路、アミノ酸およびポリアミン代謝、プリン体およびピリミジン代謝経路など、まさにエネルギー代謝に関与する物質群の一斉定量に適している。また、膨大なメタボロームデータの比較解析や解釈を促進するソフトウェアの開発も同時に行っている。例えばJDAMP<sup>2)</sup>は、比較検討したい2群のサンプル(例えば腫瘍および正常組織、あるいは遺伝子欠損株および野生株)から得られたメタボロームデータを網羅的に比較し、有意差のある物質のみを二次元マップに表示させること

が可能である。また、同位体標識した物質(例えば<sup>13</sup>C-グルコースなど)を細胞内に取り込ませることで生成される同位体組成の異なる異性体(アイソトポマー)を測定し、添加した同位体標識物質の細胞内における代謝流束を計算的に予測するソフトも開発した<sup>9)</sup>。メタボローム解析からバイオマーカーの候補となるピークが検出された場合には、MS/MS解析<sup>2)</sup>やニューラルネットワーク<sup>10)</sup>を応用した手法により未知物質の同定も行っている。これら一連の基盤技術の確立により(図1)、CE-MSを主軸としたわれわれのメタボローム解析技術は、癌研究のみならず医療・環境・食品関連など幅広い分野への応用が可能である。

## 2 乏血性癌の微小環境と代謝

癌細胞が好氣的環境下でも酸化的リン酸化よりむしろ解糖系依存的に代謝を行う現象はワーバーク効果<sup>\*2 11)</sup>と呼ばれ、さまざまな癌種において確認されている。



Panc-1細胞の時系列メタボローム

Glc<sup>-</sup>, 20%O<sub>2</sub> : ◻  
 Glc<sup>-</sup>, 0.1%O<sub>2</sub> : ●

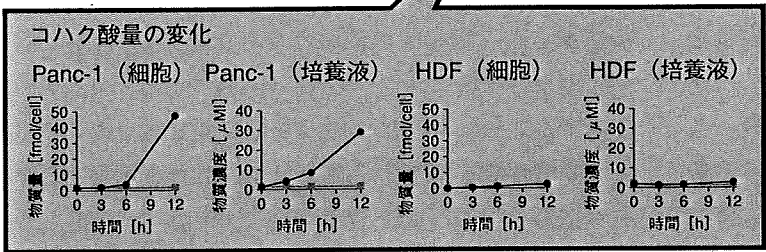
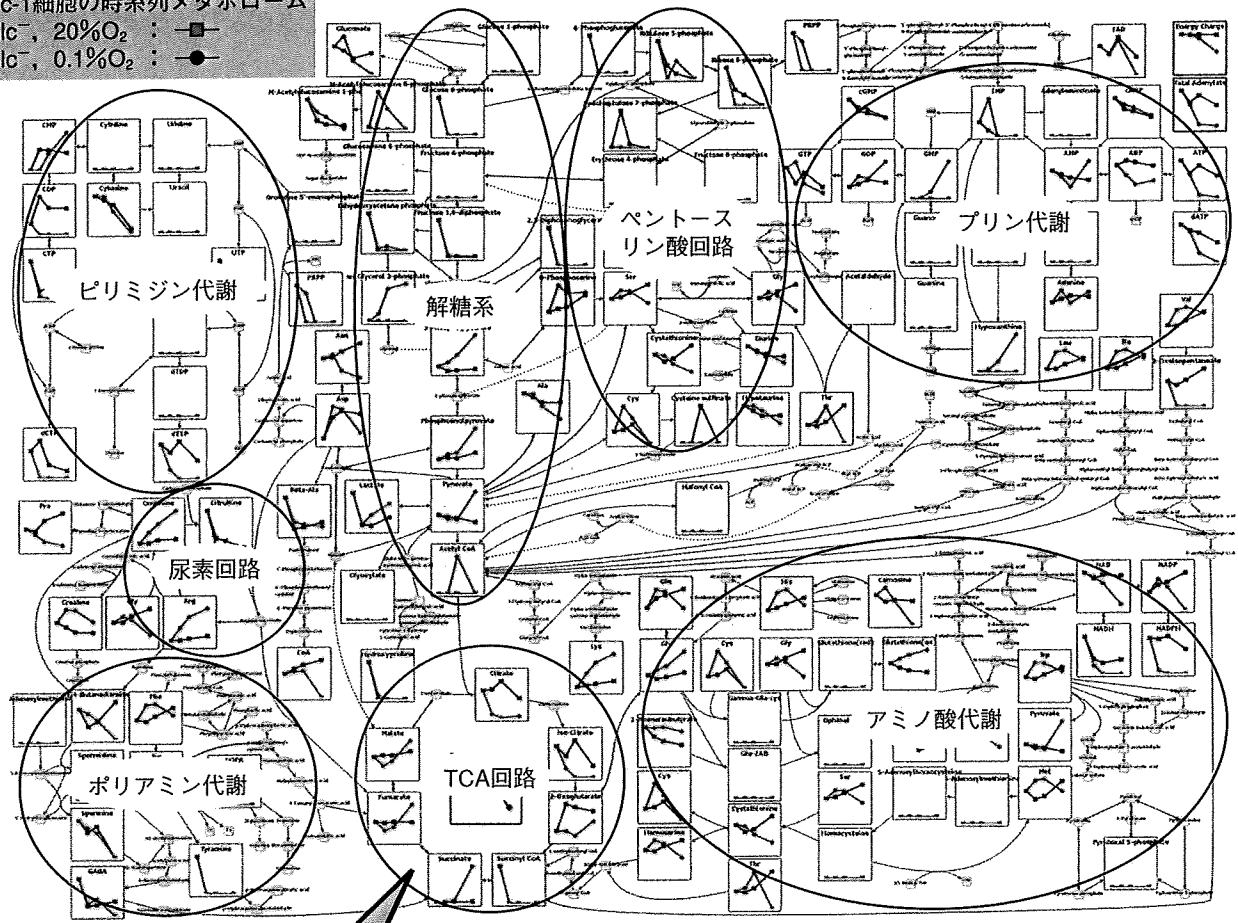


図2 Panc-1細胞におけるグルコース欠乏かつ常酸素 (Glc<sup>-</sup>, 20% O<sub>2</sub>) またはグルコース欠乏かつ低酸素 (Glc<sup>-</sup>, 0.1% O<sub>2</sub>) 条件下での時系列メタボロームデータ VANTED<sup>17)</sup> により代謝マップ上に可視化した。サンプリングはそれぞれ, 0, 3, 6, 12時間後, 縦軸は1細胞あたりに換算した物質質量を示す。またコラム内はPanc-1およびHDF細胞それぞれの細胞および培養液中のコハク酸量の変化を示す

癌細胞によるグルコースの取り込み効率が高いことを利用した近年のPET診断<sup>12)</sup>は、まさに癌の代謝特性

を利用した画期的な癌の早期発見手法である。しかしながら、膵臓癌など一部の癌種では血流が乏しいために酸素およびグルコースの供給が不十分となり、癌細胞が栄養的にきわめて劣悪な環境で生存・増殖していることが知られている<sup>13)</sup>。このような癌は早期発見が難しいばかりでなく、標準的な化学療法によっても奏効率は低く再発の可能性が高い。したがって、このような癌細胞のエネルギー代謝を解糖系の亢進だけで説明することは難しく、多血性で栄養的に恵まれた環境

**※2 ワーバーグ効果**  
 ドイツ人生理学者オットー・ワーバーグ (Otto Warburg) により報告された。多くの癌細胞が酸素の有無にかかわらず主に解糖系に依存したエネルギー代謝を行う現象。この現象が生じる原因として、低酸素環境への適応や癌遺伝子によるミトコンドリア機能の抑制などがあげられているが、近年さらに議論が白熱している。



で増殖する癌種とは異なるエネルギー代謝を行っている可能性がある。血流不足により解糖も酸化リン酸化も慢性的に制限された環境において、細々と、しかし着実に生き永らえる癌細胞は、増殖に必要なエネルギーをいったいどのように捻出しているのだろうか？ われわれは、上述したCE-MSによるメタボローム解析技術を応用し、このような乏血性癌細胞のエネルギー代謝に関するジレンマの解明を試みた。

### 3 メタボローム解析による癌細胞の特殊なエネルギー代謝機構の解明

#### 1) グルコースも酸素もなしに癌細胞はATPをつくれるか？

グルコース欠乏かつ低酸素状態における癌細胞の生き残り戦略をエネルギー代謝の観点から解明する目的で、膵臓癌の培養細胞であるPanc-1およびヒト皮膚線維芽細胞であるHDFを用いて時系列メタボローム解析を行った。具体的には、グルコース欠乏かつ常酸素 ( $\text{Glc}^-$ ,  $\sim 20\% \text{O}_2$ ) またはグルコース欠乏かつ低酸素 ( $\text{Glc}^-$ ,  $\sim 0.1\% \text{O}_2$ ) 状態に暴露したPanc-1およびHDFから経時的に細胞および培養液をサンプリングし、CE-MSによりメタボローム測定を行い、エネルギー代謝に関連する130種の物質について定量を行った (図2: Panc-1の細胞内メタボロームデータのみ掲載)。興味深いことに、Panc-1ではグルコース欠乏かつ低酸素ストレス負荷後12時間で、コハク酸が細胞あたり量で40倍以上、培養液中濃度で20倍以上も増加した (図2コラム)。

解糖系およびクエン酸回路中間物質の多くが枯渇するなかで、コハク酸の蓄積は一見意外である。しかしながら、実は嫌気性微生物や回虫などの寄生虫およびある種の二枚貝では、嫌気環境においてフマル酸呼吸<sup>\*3</sup> (特に寄生虫では「NADH-フマル酸還元系」と呼ばれる特殊な代謝を行うことによりATPを嫌氣的に生成し、その副産物としてコハク酸が大量に蓄積

#### ※3 フマル酸呼吸

電子伝達系における電子の最終受容体として酸素分子の代わりにフマル酸を使いコハク酸を生成し、共役する複合体 (複合体1) の働きによりプロトンの勾配を生じさせATP合成を行う反応。通常の酸化リン酸化によるATP合成に比べエネルギー効率は悪いが、無酸素下でATPの合成が可能であるため、嫌気性微生物や寄生虫、ある種の二枚貝などでその存在が確認されている。

することが知られている<sup>14)</sup>。これは、電子伝達系における最終的な電子の受容体として酸素の代わりにフマル酸が使われ、結果として水ではなくコハク酸を生成することによりミトコンドリア膜間腔のプロトン勾配を維持しATP生成を可能にするものである (図3)。つまり、リンゴ酸からフマル酸、そしてコハク酸の生成へと、クエン酸回路の後半部分が通常とは逆向きに回転することになりコハク酸が蓄積する。

しかしながら、哺乳類におけるフマル酸呼吸はこれまでに確認されておらず、コハク酸からフマル酸を生成するコハク酸デヒドロゲナーゼの逆反応の存在も未知であった。そこで、それぞれの細胞株からミトコンドリアを単離し、NADH存在下におけるフマル酸からコハク酸の生成、つまりフマル酸呼吸を示すミトコンドリア内膜タンパク質の逆回し活性を調べた。驚くべきことに、Panc-1およびHDFのいずれの細胞株にもフマル酸からコハク酸を生成する活性が確認され、Panc-1のそれがHDFのおよそ3倍であった (論文投稿中)。

#### 2) 虫下しが癌に効く？！

ところで体内に寄生したギョウ虫や回虫などを駆除する目的で、その薬理作用があまりはっきりしないままに古くから臨床的に使われてきた駆虫薬 (虫下し) の1つにパモ酸ピルビニウム (pyrvinium pamoate) があるが、われわれはこのパモ酸ピルビニウムが実はフマル酸呼吸を阻害する薬剤であることを示唆するデータを得ている (論文投稿中)。さらに、パモ酸ピルビニウムはPanc-1などさまざまな細胞株に対しグルコース飢餓状態においてのみ顕著な毒性を発揮しネクロシスを誘発させることが知られており、動物実験においても腫瘍の増殖抑制効果が確認されている<sup>15)</sup>。

そこで、グルコース飢餓かつ低酸素という極度の栄養飢餓状態において、Panc-1およびHDFがどの程度フマル酸呼吸依存的にATPを生成しているかを検証する目的で、この条件下にパモ酸ピルビニウムを添加したうえで再度細胞および培養液サンプルのメタボローム解析を行った。その結果、薬剤投与群ではいずれの細胞株でもコハク酸の蓄積は有意に抑えられ、特にPanc-1におけるATPは3時間で枯渇した。ここから栄養飢餓環境におけるフマル酸呼吸のATP生成に関する貢献度の高さを窺い知ることができる。

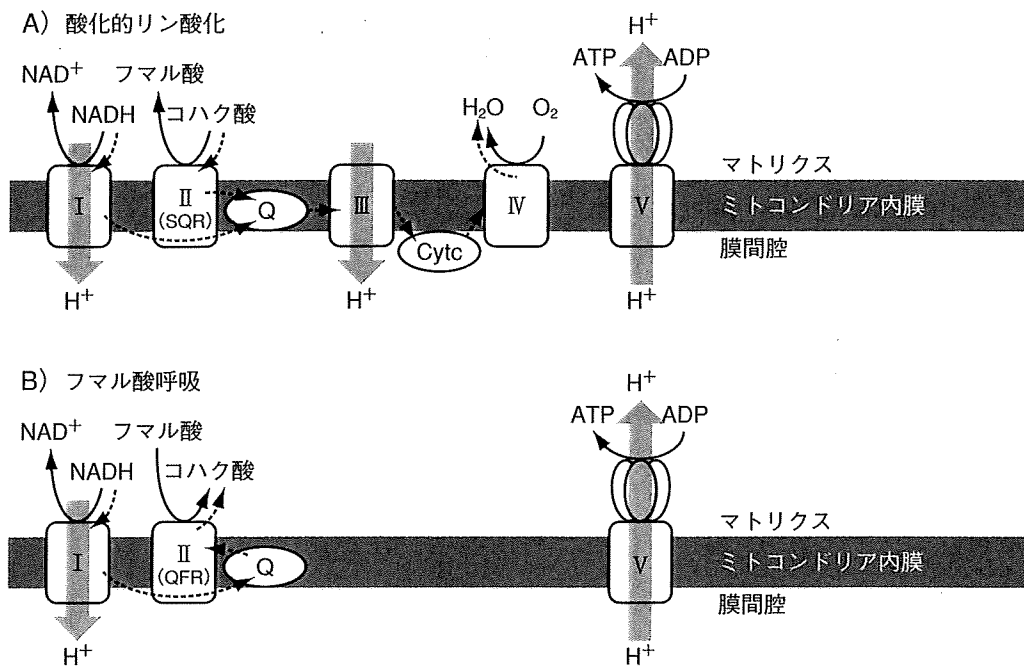


図3 酸化リン酸化 (A) およびフマル酸呼吸 (B) における電子伝達およびATP生成  
ローマ数字 (I, II, III, IV, V) はそれぞれ対応するミトコンドリア内膜複合体を, Q はキノンを, SQRはコハク酸キノ還元酵素, QFRはキノールフマル酸還元酵素, Cyt c はシトクロム c を示す. また, 実線は酵素反応による物質の変化, 破線は電子の動き, 太矢印はマトリクスおよびミトコンドリア膜間腔間のプロトンの移動を示す. 酸化リン酸化における電子の最終受容体は酸素であり水 (H<sub>2</sub>O) が生成されるが, フマル酸呼吸においてはフマル酸が電子を受容し, 結果としてコハク酸が蓄積することになる

表1 栄養状態による癌細胞のエネルギー代謝の変化

代謝	栄養状態		
	Glc <sup>+</sup> , O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Glc <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Glc <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
解糖	++	-	-
酸化リン酸化	+	++	-
フマル酸呼吸	-	+	++
副産物	乳酸, H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , コハク酸	コハク酸

### 3) グルコースと酸素の供給状態による 癌の代謝の変遷

ワーバーク効果で知られているように, グルコースと酸素がふんだんに供給される多血性の癌細胞の多くは恐らく解糖系を中心としたエネルギー代謝を行っていると考えられる. ところが, グルコース欠乏状態ではパモ酸ピルビニウムが毒性を発揮することからも, 一部のATP生成をフマル酸呼吸に依存している可能性がある. さらにグルコースも酸素も途絶えると, フマル酸呼吸に依存せざるを得なくなりコハク酸が細胞

内外に蓄積するものと考えられる (表1).

フマル酸呼吸の活性化に伴い基質となる大量のフマル酸が必要である. グルコース欠乏状態におけるフマル酸の供給源としてはアミノ酸と脂肪酸が考えられるが, 脂肪酸の分解産物であるアセチルCoAやクエン酸の増加がみられないことから, アスパラギンなど一部のアミノ酸であると思われる. また, グルコース飢餓状態や低酸素下ではオートファジーが生じやすいことが知られており<sup>10)</sup>, 分岐鎖アミノ酸を含む必須アミノ酸の増加はオートファジーの発生を示唆している. さ

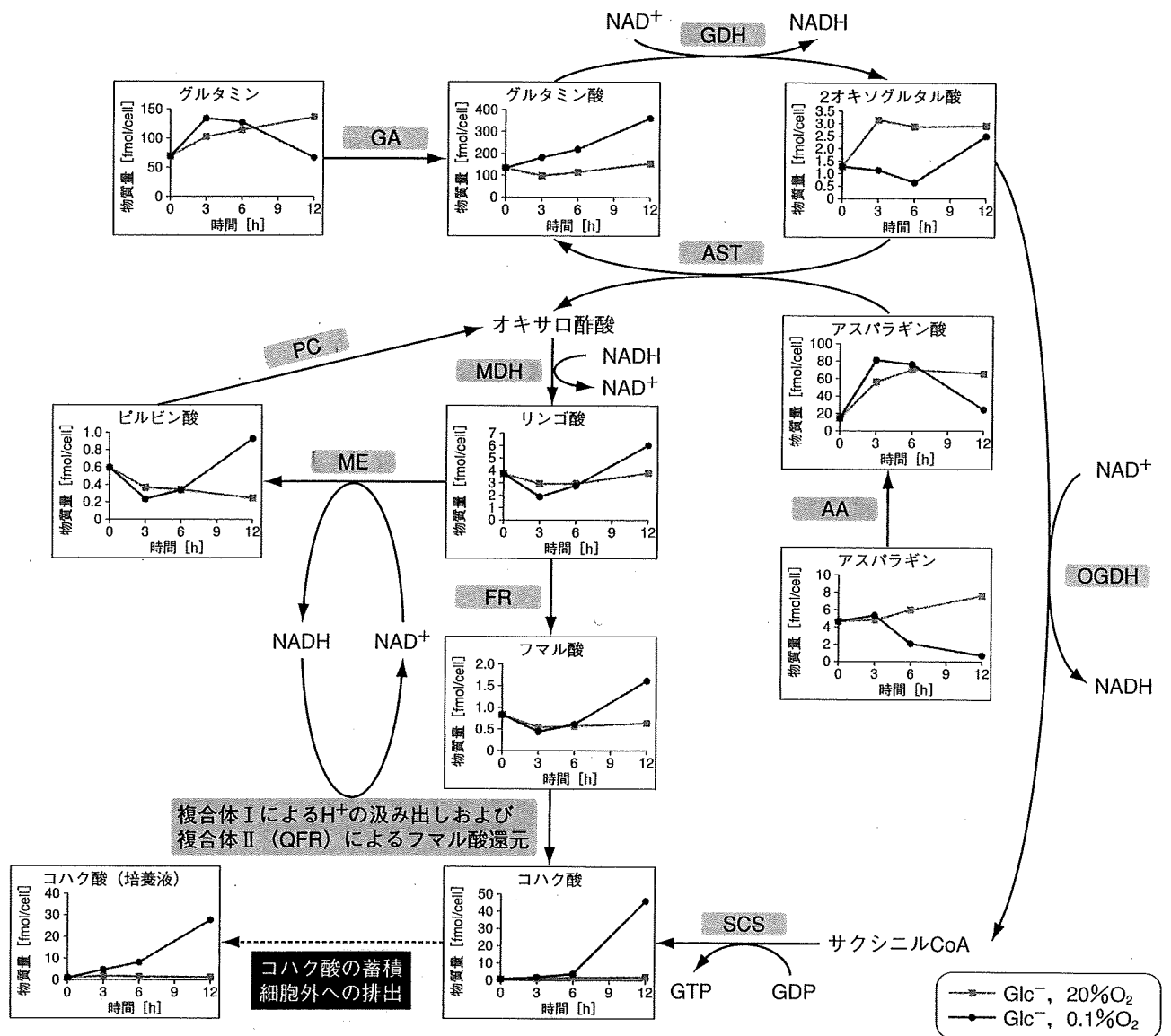


図4 栄養飢餓状態における癌細胞のフマル酸呼吸による仮説的なエネルギー代謝経路

主にアスパラギンやグルタミンよりアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) の反応によりオキサロ酢酸を生じさせ、クエン酸回路の一部を逆に回転させることによりフマル酸を供給していると考えられる。さらにリンゴ酸酵素 (ME) の反応などにより生じたNADHを基質として複合体Iを介したプロトン ( $H^+$ ) のミトコンドリア膜間腔への汲み出しを行い、複合体IIのキノール-フマル酸還元活性によりフマル酸からコハク酸を生じさせる (フマル酸呼吸)。また、クエン酸回路における2オキソグルタル酸からコハク酸までの反応により基質レベルでGTPが生成される。極度の栄養飢餓状態ではこれらの反応が活発になり、細胞内にコハク酸が蓄積し培養液中に排出されていることが示唆される。各物質量の時系列変化は、図2に示したPanc-1のメタボローム解析結果より抜粋した。各反応における酵素の略称はそれぞれ以下の酵素を示す。GDH: グルタミン酸デヒドロゲナーゼ, AST: アスパラギン酸アミノ基転移酵素, GA: グルタミナーゼ, AA: アスパラギナーゼ, PC: ビルビン酸カルボキシラーゼ, ME: リンゴ酸酵素, MDH: リンゴ酸デヒドロゲナーゼ, FR: フマラーゼ, QFR: キノール-フマル酸還元酵素, OGDH: オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ, SCS: サクシニルCoA シンセターゼ

らに複合体Iに依存するフマル酸呼吸はNADHが必須であることやグルタミン酸が顕著に増加したことなどから、極度の栄養飢餓状態における癌細胞のエネルギー代謝として図4に示したような経路が考えられる。

時系列メタボローム解析を駆使した本実験から、哺

乳類細胞ではこれまでに知られていなかった、グルコースや酸素分子に依存しないATPの生成経路の存在が示された。クエン酸回路の一部を通常とは逆向きに回転させるこのユニークな代謝経路の活性作用機序および癌細胞における存在の普遍性の解明は今後の大き

な課題であるが、パモ酸ピルビニウムの例から示唆されるように、同様の薬理作用をもつ駆虫薬が有効な抗癌剤となり得ること、そしてこのCE-MSを基軸としたメタボローム解析が全く新しい癌の治療法の開発に貢献しうることが示された。

## おわりに

本稿ではイオン性低分子化合物の網羅的測定に有用で、特に生体試料の解析に多大な威力を発揮するCE-MSを基盤としたメタボローム解析技術を紹介し、癌のメタボローム研究における具体的な応用例を紹介した。われわれは他にも癌患者由来の体液（血液・尿・唾液など）のメタボローム解析による診断バイオマーカーの同定、遺伝子改変マウスやラットの組織中のメタボローム解析による癌関連遺伝子機能の解析やそれらのエネルギー代謝との関連性の解析、そして培養細胞を用いたメタボローム解析による発癌機序における代謝変化や、異なる培養条件による細胞のさまざまな代謝適応反応の解明など、多岐に渡る癌メタボローム研究を並行して行っている。癌細胞の増殖には癌種や個人の遺伝子型を問わずATPが必須である。癌細胞のエネルギー代謝を読み解くことで、癌種や個人差に依存しない普遍的な癌治療の開発に貢献できれば幸いである。

## 謝辞

本研究の一部は厚生労働省がん研究助成金、文部科学省グローバルCOEプログラム「In Vivoヒト代謝システム生物学」、21世紀COEプログラム「環境・遺伝素因相互作用に起因する疾患研究」、山形県および鶴岡市の支援によるものである。メタボローム測定および膨大なデータの処理に関して技術的なサポートを頂いた慶應義塾大学先端生命

科学研究所の杉本昌弘博士、戸谷吉博氏、五十嵐沙織氏、および小池沙香氏にこの場を借りて深謝いたします。

## 文献

- 1) Soga, T. et al. : J. Proteome Res., 2 : 488-494, 2003
- 2) Soga, T. et al. : J. Biol. Chem., 281 : 16768-16776, 2006
- 3) 「メタボローム研究の最前線」(富田勝, 西岡孝明/編), シュプリンガーフェアラーク東京, 2003
- 4) Yoshida, S. et al. : Appl. Environ. Microbiol., 74 : 2787-2796, 2008
- 5) Ishii, N. et al. : Science, 316 : 593-597, 2007
- 6) Soga, T. et al. : Anal. Chem., 74 : 2233-2239, 2002
- 7) Sato, S. et al. : Plant. J., 40 : 151-163, 2004
- 8) Kinoshita, A. et al. : J. Biol. Chem., 282 : 10731-10741, 2007
- 9) Toya, Y. et al. : J. Chromatogr. A, 1159 : 134-141, 2007
- 10) Sugimoto, M. et al. : Anal. Chem., 77 : 78-84, 2005
- 11) Warburg, O. : Science, 123 : 309-314, 1956
- 12) Gambhir, S. S. : Nat. Rev. Cancer, 2 : 683-693, 2002
- 13) Izuishi, K. et al. : Cancer Res., 60 : 6201-6207, 2000
- 14) Kita, K. et al. : Trends Parasitol., 23 : 223-229, 2007
- 15) Esumi, H. et al. : Cancer Sci., 95 : 685-690, 2004
- 16) Mathew, R. et al. : Nat. Rev. Cancer, 7 : 961-967, 2007
- 17) Junker, B. H. et al. : BMC Bioinformatics, 7 : 109, 2006

## <筆頭著者プロフィール>

紙健次郎：カリフォルニア大学サンディエゴ校生物工学部および細胞生物学生化学部を卒業後、現在慶應義塾大学政策・メディア研究科博士課程に在籍。グローバルCOE研究員。国立がんセンターの他、さまざまな大学および研究機関と癌メタボロームに関する共同研究を進める傍ら、慶應義塾大学先端生命科学研究所在する山形県鶴岡市の地元民とジャズバンドを結成し音楽活動にも余念がない。

## 2

# 最新のメタボローム測定法の開発と生命科学への応用

曾我 朋義

### 1. はじめに

メタボローム(全代謝物の総称)解析は、細胞内に数百から数万種類存在する代謝物を大規模に測定し、遺伝子発現や酵素活性との相互関係を明らかにして、代謝や細胞の働きを包括的に理解しようとする方法論である。代謝制御機構、シグナル伝達経路、酵素やトランスポーターの機能解明のみならず、代謝異常やがんなどの機序解明、新規バイオマーカーの探索、疾病診断、創薬、微生物発酵による物質生産法の改善、環境変化に強い農作物の開発など、メタボローム解析は幅広い分野で有効な解決策を与えるのではないかと期待されている。

解糖系やTCA回路に代表される中心代謝経路の代謝中間体の多くはリン酸基、カルボキシル基(カルボキシ基ともいう)やアミノ基をもつイオン性物質である。イオン性が高い物質は一般に細胞膜を通過することができないため、細胞は重要な代謝物に極性官能基を与え細胞内に引き留めている。大腸菌の場合は、代謝物の8割以上が高いイオン性をもつ。それ以外にも代謝物はUV吸収がない、不揮発性、物理的・化学的性質が類似したものから、まったく異なる性質をもつものが混在するなどの特徴をもつ。このような性質をもつ化合物に対して網羅的な測定法は開発されておらず、さらに細胞内に数百から数万種類の代謝中間体が存在することが、メタボローム分析をきわめて難しくしていた。

筆者らが開発したキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)によるメタボローム分析法は、数千種類のイオン性代謝物質の一斉分析を可能にした<sup>1)</sup>。これまでにCE-MS法を微生物<sup>1,2)</sup>、植物<sup>3)</sup>、動物<sup>4,5)</sup>など、さまざまな生物種に応用し、いくつかの新しい知見を得た。マウスのモデルでは、薬物によって急性肝炎が誘発された際に血液中で急増するバイオマーカーを発見し<sup>4)</sup>、赤血球のヘモグロビンが低酸素を感知して解糖系を活性化する機序を解明した<sup>5)</sup>。またメタボロームに加え、トランスクリプトーム、プロテオーム測定も駆使して数千種類の大腸菌の細胞内分子を徹底的に分析し、大腸菌が遺伝子の欠失や生育条件の変化に対して、さまざまな手段で代謝を安定化していることを実証した<sup>2)</sup>。



曾我 朋義(そが ともよし)先生:1959年新潟県生まれ。1984年慶應義塾大学工学部応用化学科卒業。現在、慶應義塾大学環境情報学部教授、同先端生命科学研究所教授および同医学部教授(兼任)、工学博士。おもな研究テーマは「メタボローム測定法の開発、代謝の解明、バイオマーカー探索」。

#### メタボローム

細胞、組織中の全代謝物の総称。代謝物は最も少ない微生物で数百種類、最も多い植物で数万種類存在するといわれる。メタボロミクス(metabolomics)はメタボローム研究を示す。

CE-MS

キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis) と質量分析計 (mass spectrometry) を組み合わせた分析法。内径 50  $\mu\text{m}$ 、長さ数十 cm 程度の中空のキャピラリー (毛细管) に数万 V の高電圧を印加することによって、イオン性物質を電荷と水和イオン半径の比に基づいて分離後、質量分析計に導入し検出する方法。

FT-ICRMS

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry) の略。一様磁場中のイオンのサイクロトロン周波数を検出して、 $m/z$  (質量電荷比。イオンの質量  $m$  を電荷数  $z$  で割った値) の異なるイオンを検出する質量分析法。

イオンサプレッション

エレクトロスプレーイオン化法の場合、イオン性の夾雑物が大量に存在するとイオンになりやすい物質が優先的にイオン化されてしまい、目的物のイオン化が妨害される現象。イオンサプレッションは、実際には目的物が存在するのに検出されないといった問題を惹起する。

エレクトロスプレーイオン化法

電気伝導性の溶液を細管に通し先端に数千 V の電圧を印加すると、帯電した均一で微細な液滴として噴霧される。その液滴に加熱した窒素ガスなどを噴きつけて溶媒を蒸発させることによって試料分子のイオンを生成する方法。LC-MS や CE-MS のインターフェースとして用いられる。

メタボロミクスの対象はリン酸化合物、有機酸、アミノ酸、脂質、リン脂質、多糖、複合糖質など多岐にわたるが、本稿では、筆者らが取り組んでいる CE-MS によるイオン性メタボロームの測定技術とその応用に焦点を絞って解説する。

2. CE-MS によるメタボローム測定法

2.1 なぜ CE-MS か?

メタボローム研究への関心の高まりとともに、いくつかのメタボローム測定法<sup>6-10)</sup>が開発された。しかし GC/MS 法は誘導体化反応が必要であり<sup>6)</sup>、また誘導体化しても測定できない代謝物も多い。NMR<sup>7)</sup>はイオン性物質の検出を得意とせず、また感度が著しく低い。FT-ICRMS 法などの高分解能の質量分析計を用いた直接注入分析法<sup>8,9)</sup>は、イオンサプレッションの影響を受け定量性に乏しく、また異性体が分離しない。LC-MS<sup>10)</sup>はイオン性物質の分離能が低く、イオンサプレッションを受けて定量性に乏しいなど、どの方法もイオン性のメタボローム測定には問題点があった。

筆者らは、イオン性化合物に対して高い分離能をもつキャピラリー電気泳動 (CE) と高感度・高選択検出器である質量分析計 (MS) を組み合わせた CE-MS<sup>(11-13)</sup> によるメタボローム測定法を開発した。測定原理を図 1 に示す。CE-MS に注入された各代謝物質は、電気泳動によりキャピラリー内で分離後、質量分析計で検出される。試料中の陽イオン性物質は陰極方向に、反対に陰イオン性物質は陽極方向にその物質の (電荷)/(水和イオン半径) の比に基づき速度で移動し、キャピラリー出口に接続した質量分析計によって選択的に検出される。筆者らは三種類の CE-MS 法を用いて、細胞内に存在する 1000 種類以上の代謝物の一斉分析に成功した<sup>11)</sup>。

メタボローム測定に CE-MS を選択したのもう一つの理由は、定量性の高さである。LC-MS 法では、細胞のようなイオン性化合物が大量に存在する試料は、イオンサプレッションを惹起し定量性が著しく低下する。一方、CE-MS では試料の注入量 (数~数十 nL レベル) は LC-MS に比べてきわめて少ないため、イオンサプレッションが起きにくい。最近実施した大腸菌のメタレオミクス分析における標準

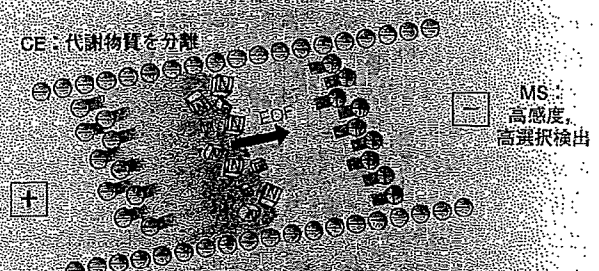


図 1 CE-MS による代謝物一斉分析法

高電圧をキャピラリーに印加すると陽イオンは陰極へ、陰イオンは陽極へ移動しながら分離する。陰極側の陽極に質量分析計を接続すれば、各イオンとその物質が固有にもつ質量数により選択的に検出できる。

物質の添加回収試験では、LC-MS ではほとんどのヌクレオチドが回収率 20~40% であるのに対して、CE-MS での回収率は 90~100% であった<sup>14)</sup>。この結果は、LC-MS ではイオンサプレッションによってヌクレオチド類を正確に定量分析できないことを示す。一方、イオンサプレッションの影響を受けない CE-MS は各成分の正確な定量分析が可能である。以上の理由から、筆者らは細胞や組織のような夾雑成分の多い試料中のイオン性メタボロームの測定には CE-MS が必須であると考えている。以下に CE-MS 法によるメタボローム測定法の詳細について記す。

## 2.2 陽イオン性代謝物の測定法

陽イオン性代謝物の測定では、キャピラリーの出口が陰極となるよう電圧を印加する。泳動緩衝液には 1 M のギ酸 (pH 2 以下) を使用した<sup>11)</sup>。1 M ギ酸は pH が低いためアミノ基は解離し、カルボキシル基やリン酸基の解離は抑制される。したがってアミノ基をもつ代謝物は陽イオン性を帯び、高電圧の印加によって陰極方向に泳動し、質量分析計で一斉分析される。本法を用いることにより一つの CE-MS 条件で、現在までに 364 種類の陽イオン性代謝物標準液が測定されている。

## 2.3 陰イオン性代謝物の測定法

解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸経路などのエネルギー代謝の代謝物質は陰イオン性をもつ。しかし通常のフューズドシリカキャピラリーを使用した CE-MS 陰イオン測定システム (図 2a) では、試料注入後、数分で電流が流れなくなる問題が発生する。理由は、このシステムでは電圧を印加した際に、電気浸透流と呼ばれる液流が陽極 (MS 側) から陰極 (キャピラリーの入口側) に発生するため、

### フューズドシリカ キャピラリー

熔融石英の材質からできた毛細管。一般には内径数十  $\mu\text{m}$ 、外径 350  $\mu\text{m}$ 、長さ数十 cm の中空の細長い円筒形の物がキャピラリー電気泳動の分離カラムとして使われる。

### 電気浸透流

キャピラリーに電解質溶液 (泳動液) を満たすとキャピラリー内壁とこれに接する電解質溶液の間に電気二重層が形成される。ここに電圧を印加すると電解質溶液が溶媒を伴って移動し、電気浸透流が発生する。内表面が負に帯電するフューズドシリカキャピラリーを用いた場合は、陽極から陰極方向に電気浸透流が発生する。

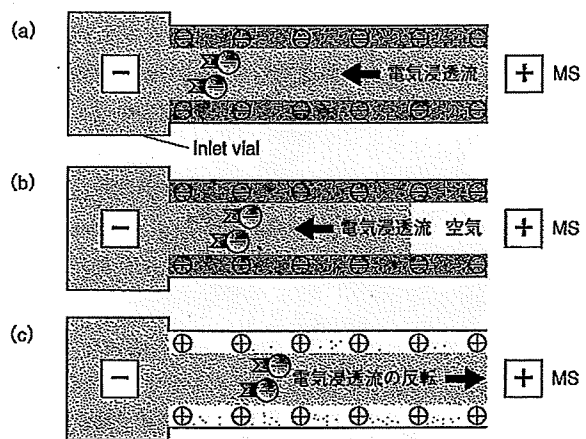


図2 CE-MS による陰イオン性化合物の測定法

- (a) 通常使用するフューズドシリカキャピラリーでは電気浸透流が陰極方向に発生し、  
 (b) キャピラリーの出口に空気が入るため、電流が流れなくなる。これを解決するため (c) 表面が正に帯電した SMILE (+) キャピラリーを用いて電気浸透流を反転することにより、陰イオン性化合物の測定が可能になった。



SMILE(+)キャピラリー  
 フェーズドシリカキャピラリー  
 の内表面の一層目を塩基性ポリ  
 マーであるポリブレン、二層目  
 を酸性ポリマーであるデキスト  
 ラン硫酸、三層目をポリブレン  
 でコーティングしたキャピラ  
 リー。内表面は陽イオン性を帯  
 びており、電解質溶液を満たし  
 て電圧を印加すると陰極から陽  
 極方向へ電気浸透流が反転す  
 る。

シラノール基  
 フェーズドシリカキャピラリー  
 の表面のSiOH基。pK<sub>a</sub>は7.1で  
 あり、pHが高いとSiO<sup>-</sup>に解離  
 する。

キャピラリーの出口側に空気が入るからである(図2b)<sup>12)</sup>。この問題を解決す  
 るため、筆者らは、塩基性物質を内表面にコーティングしたSMILE(+)キャピラ  
 リー<sup>13)</sup>を用いて電気浸透流を陰極から陽極に反転する方法を考案し(図2c)、連続  
 的かつ安定した陰イオン性化合物の測定を可能にした<sup>12)</sup>。本法により277種類の  
 陰イオン性代謝物標準液が分析できることを確認している。

2.4 ヌクレオチド類の測定法

ヌクレオチド類やCoA類は、通常のpHでは陰イオン性をもつ。しかし前述の  
 陰イオン測定条件では、いくつかのヌクレオチドやCoAがSMILE(+)キャピラ  
 リーの表面に吸着し検出できなかった<sup>13)</sup>。そこで通常のフェーズドシリカキャ  
 ピラリーを用いて新しい測定条件を開発した<sup>14)</sup>。しかしATP、GTPなどのリン酸  
 基を多くもつヌクレオチド類はフェーズドシリカキャピラリーにも吸着した。原  
 因はヌクレオチドのリン酸基がフェーズドシリカ表面のシラノール基と水素結合  
 することであった。そこで、あらかじめリン酸バッファでキャピラリーを洗浄  
 し、シラノール基をリン酸でマスクングすることで吸着を防いだ<sup>14)</sup>。また電気浸

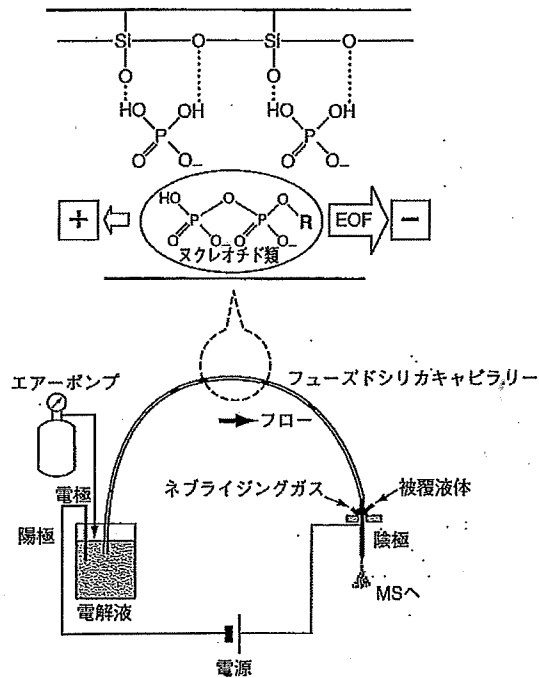


図3 Pressure-assisted CE-MSによるヌクレオチド類の測定法<sup>14)</sup>  
 あらかじめリン酸バッファでキャピラリーを洗浄し、キャピラリー内表面のシラ  
 ノール基をリン酸で覆い、シラノールへのヌクレオチドのリン酸基の吸着を防ぐ。  
 その後試料を注入し、電気泳動を行う。ヌクレオチド自体は陰イオンなので陽極  
 方向に泳動するが、陰極方向に発生する電気浸透流とエアープンプによる加圧に  
 よって、ヌクレオチドは陰極方向に運ばれ、陰極に接続した質量分析計によって  
 検出される。

透流とエアープンプによる加圧によって、ヌクレオチド類、CoA 類を陰極に押し出す方法を用いることにより大幅に分析時間を短縮した(図 3)<sup>14)</sup>。本法により、安定で定量的なヌクレオチド類、CoA 類の分析を可能にした。

### 2.5 CE-TOFMS 法の開発

最近、筆者らはスルーブット、分解能、感度を飛躍的に高めるため、従来の四重極質量分析計(QMS)より数千倍スキャンスピードが速く、高質量数範囲をカバーでき、かつミリマスユニット(整数質量の 1/1000 単位)の質量精度で検出できる飛行時間型質量分析計(TOFMS)を CE に接続した<sup>4)</sup>。CE-TOFMS は従来の CE-QMS 法に比べ 30 倍のスルーブットの向上、ミリマスユニットの質量精度での検出を可能にした。また CE-QMS 法に比べ CE-TOFMS 法ではほとんどの物質で数倍から数十倍の高感度検出(100 nM レベル)が可能になった<sup>4)</sup>。定量性も高いため、CE-TOFMS 法は今後さわめて強力なイオン性メタボロームの測定法となるであろう。

## 3. 生命科学への応用

### 3.1 アセトアミノフェンに惹起された急性肝炎のバイオマーカーの発見

筆者らは慶應義塾大学医学部の末松誠教授らと共同で、薬物投与時にグルタチオンの低下に伴って誘発された急性肝炎の低分子バイオマーカーの発見に成功した。米国では解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン(AAP)の過剰摂取により、年間 100 名以上が急性肝炎で死亡する。そこで AAP をマウスに過剰投与して急性肝炎を惹起し、マウスの肝臓の代謝物質を CE-TOFMS でメタボローム測定した<sup>7)</sup>。マウスの肝臓から全部で 1859 成分のピークを検出し、そのなかから、急性肝炎マウス(AAP 投与後 1~2 時間)で大きく増加する物質(成分名は未知)を発見した<sup>4)</sup>。

CE-QqTOFMS を用いて、この物質の MS/MS スペクトルを採取し解析した結果、この物質は還元型グルタチオン(GSH)の SH 基が CH<sub>3</sub> 基に置換されたオフタルミン酸と推定された。オフタルミン酸の標品を入手し、マウスの肝臓サンプルに添加して、再び CE-TOFMS と CE-QqTOFMS で測定したところ、この物質とオフタルミン酸の移動時間および MS/MS スペクトルが完全に一致したため、この物質をオフタルミン酸と特定した<sup>4)</sup>。

さらに AAP をマウスに投与し、肝臓や血清中の代謝物質の経時変化を測定した(図 4)。図 4(a) に示すように肝臓内の GSH は急性肝炎が誘発される AAP 投与 1, 2 時間後に大幅に減少した。このときに GSH の減少に反比例して肝臓内のオフタルミン酸の前駆体である  $\gamma$ -Glu-2AB とオフタルミン酸が急増した。図 4(b) に示したように血清中でもオフタルミン酸は肝臓中と同様に AAP 投与 1, 2 時間後に増加した。この結果は、血中のオフタルミン酸が、過剰の AAP により GSH が低下することを表す有力なバイオマーカーであることを示す<sup>4)</sup>。

このモデルでオフタルミン酸が肝臓や血液で増加する機序も解明した。通常の還元状態(図 5a)では、肝細胞内に GSH が大量に存在し、これが  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素をフィードバック制御するために GSH やオフタルミン酸の生

#### グルタチオン

グルタチオンには還元型(GSH)と酸化型(GSSG)が存在し、細胞内の 98% 以上が還元型である。還元型グルタチオンは細胞内の主要な抗酸化物質であり、細胞内に高濃度で存在し、細胞をさまざまな酸化ストレスから守る役割を果たす。

#### QqTOFMS

ハイブリッド型の MS/MS 装置。装置に導入されたイオンは四重極マスフィルター Q でプリカーサーイオンとして選択後、高周波電圧のみの衝突室 q で多重回衝突によって分解され、その生成イオンを真空の管中で飛行させて検出器までの到達時間によりイオンを分離する方式の質量分析計。目的物質の精密質量の MS/MS スペクトルを取得することが可能。

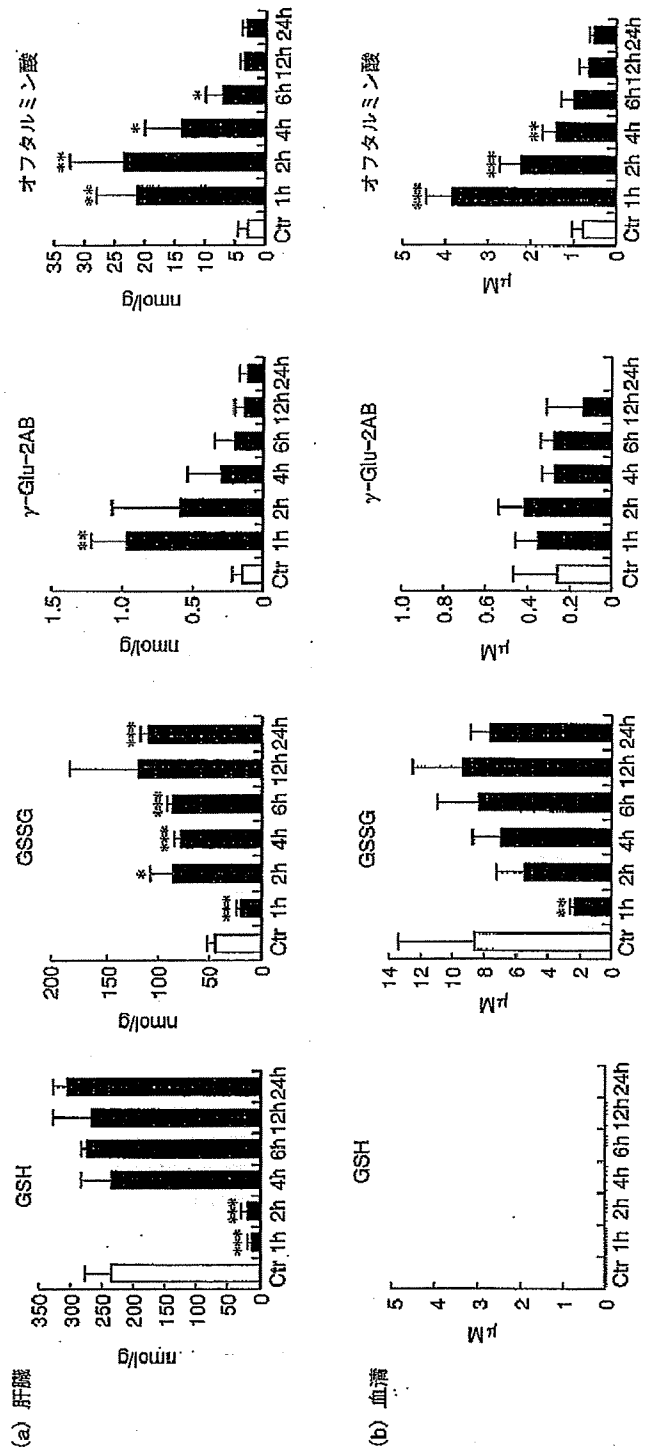


図4 AAP投与後に肝臓および血清中で変化のあった代謝物質<sup>4)</sup> AAPをマウスに投与し、肝臓や血清中の代謝物質の経時変化を測定した。肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAAP投与1, 2時間後に大幅に減少した。このとき肝臓内および血清中のオフタルミン酸は反対に増加した。したがって血中オフタルミン酸は、薬物投与により誘発されるGSHの低下を示す低分子バイオマーカーになる。

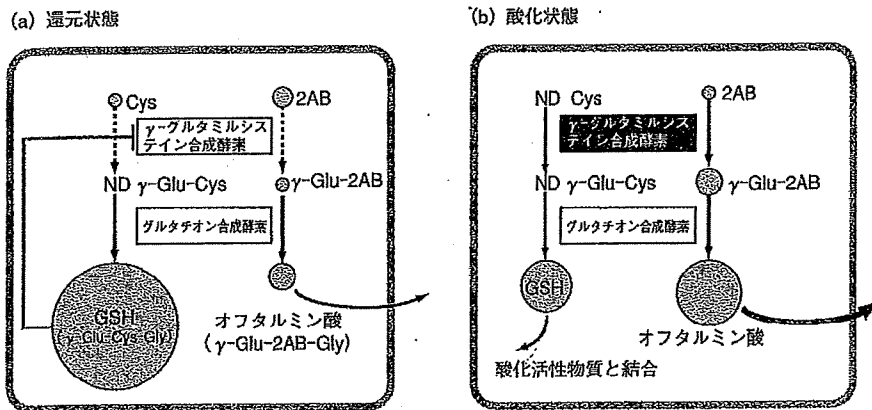


図5 肝細胞のオファタルミン酸合成経路<sup>4)</sup>

通常の還元状態では、肝細胞のGSHがγ-グルタミルシステイン合成酵素をフィードバック制御しているためGSHやオファタルミン酸の合成は阻害される。酸化状態ではGSHの消費に伴いフィードバック制御が解除され、γ-グルタミルシステイン合成酵素が活性化される。したがって肝細胞にオファタルミン酸が生成される。オファタルミン酸は肝細胞内に蓄積され、ABCトランスポーターなどで胆汁中に輸送される。

合成は阻害される<sup>16,17)</sup>。しかし肝臓内で生成された酸化活性物質(NAPQI)によってGSHが消費されると(図5b)、フィードバック制御が解除され、γ-グルタミルシステイン合成酵素が活性化されるためオファタルミン酸が生成される。オファタルミン酸は肝細胞内に蓄積し、ABCトランスポーターなどで胆汁中に輸送され最終的に血液中に排泄される(図5)<sup>4)</sup>。

NAPQI

*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine の略。AAPの一部が肝臓内のシトクロムP450によって代謝され、生成された中間体、強い酸化活性物質であり、肝臓内に蓄積するとさまざまなタンパク質と反応し、肝細胞の壊死を引き起こす。

3.2 マルチオミクス測定による大腸菌の代謝解明

筆者が所属する慶應義塾大学先端生命科学研究所では、最新のトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム技術を駆使して、さまざまな比増殖速度にある大腸菌野生株や一遺伝子破壊株の細胞内分子を徹底分析した。その結果、大腸菌細胞の内外の変動に対する代謝の頑強性に関する知見を得た。

まず4288個ある大腸菌K12株の遺伝子のうち致死となるものを除き、遺伝子一つずつ欠失させた変異体を3984種類作成した(KBIOコレクション)<sup>18)</sup>。そのなかから解糖系とペントースリン酸経路にかかわる遺伝子を欠失させた大腸菌24株を選出し、野生株についてはさまざまな増殖速度で連続培養によって生育させた。これらの大腸菌の細胞内分子についてトランスクリプトーム(定量PCRおよびDNAマイクロアレイ)、プロテオーム(LC-MS/MS法および二次元電気泳動)、メタボローム(CE-TOFMS)、フラックソーム(代謝流束)を測定した<sup>2)</sup>。得られたデータを解析した結果、大腸菌は環境変化に応じて増殖速度を変える場合、遺伝子発現を積極的に制御し、細胞内の代謝物質レベルを安定に保っていることを見いだした。一方、一遺伝子欠損に対しては基本的に、とくに積極的な対応を行わず、代謝経路自体の頑強性(アイソザイムの存在や迂回経路の形成)によって代謝物質レベルが安定に保たれるようになっていた。この結果から、大腸菌は状況に

代謝流束

各代謝経路を流れる代謝物質量を単位細胞量当りの数値で表現したもの。

応じてさまざまな手段を駆使して代謝を安定化していることが示唆された<sup>2)</sup>。

#### 4. おわりに

CE-MS 法や最新の CE-TOFMS 法は、細胞内に存在する数千のイオン性代謝物質の高感度かつ一斉分析を可能にした。本法はアセトアミノフェン投与マウスや大腸菌の例で示したように、細胞がダイナミックに変化する際に代謝物質の変動を一斉にかつ経時的に測定することができ、代謝の変動を解明するきわめて有効な手段である。今後、CE-MS によるメタボローム測定法がさまざまな研究分野で広く利用され、生命科学のさらなる発展に貢献することを期待したい。

#### 参考文献

- 1) T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, T. Nishioka, *J. Proteome Res.*, 2, 488(2003).
- 2) N. Ishii, K. Nakahigashi, T. Baba, M. Robert, T. Soga, A. Kanai, T. Hirasawa, M. Naba, K. Hirai, A. Hoque, P. Y. Ho, Y. Kakazu, K. Sugawara, S. Igarashi, S. Harada, T. Masuda, N. Sugiyama, T. Togashi, M. Hasegawa, Y. Takai, K. Yugi, K. Arakawa, N. Iwata, Y. Toyu, Y. Nakayama, T. Nishioka, K. Shimizu, H. Mori, M. Tomita, *Science*, 316, 593 (2007).
- 3) S. Sato, T. Soga, T. Nishioka, M. Tomita, *Plant J.*, 40, 151 (2004).
- 4) T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakuragawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishioka, M. Tomita, *J. Biol. Chem.*, 281, 16768 (2006).
- 5) A. Kinoshita, K. Tsukada, T. Soga, T. Hishiki, Y. Ueno, Y. Nakayama, M. Tomita, M. Suematsu, *J. Biol. Chem.*, 282, 10731 (2007).
- 6) O. Fiehn, J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R. N. Trethewey, L. Willmitzer, *Nat. Biotechnol.*, 18, 1157 (2000).
- 7) N. V. Rao, *Drug Chem. Toxicol.*, 25, 375 (2002).
- 8) A. Aharoni, C. H. Ric de Vos, H. A. Verhoeven, C. A. Mallepaard, G. Kruppa, R. Bino, D. B. Goodenowe, *OMICS*, 6, 217 (2002).
- 9) J. I. Castrillo, A. Hayes, S. Mohammed, S. J. Gaskell, S. G. Oliver, *Phytochemistry*, 62, 929 (2003).
- 10) R. Plumb, J. Granger, C. Stumpf, L. D. Wilson, J. A. Evans, R. M. I. enz, *Analyst*, 128, 819 (2003).
- 11) T. Soga, D. N. Heiger, *Anal. Chem.*, 72, 1236 (2000).
- 12) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, T. Nishioka, *Anal. Chem.*, 74, 2233 (2002).
- 13) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita, T. Nishioka, *Anal. Chem.*, 74, 6224 (2002).
- 14) T. Soga, T. Ishikawa, S. Igarashi, K. Sugawara, Y. Kakazu, M. Tomita, *J. Chromatogr. A*. doi: 10.1016/j.chroma.2007.05.054.
- 15) H. Katayama, Y. Ishihara, N. Asakawa, *Anal. Chem.*, 70, 5272 (1998).
- 16) P. G. Richman, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, 250, 1422 (1975).
- 17) J. W. Cuozzo, C. A. Kaiser, *Nat. Cell Biol.*, 1, 130 (1999).
- 18) T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.*, 2 (2006). doi: 10.1038/msb4100050.